

PENGARUH FORMALIN DAN pH TERHADAP DAYA HIDUP SPERMATOZOA S API YANG DISIMPAN PADA SUHU RUANGAN MAUPUN 5°C

[Effect of Formalin and pH on The Viability of Bull Spermatozoa Stored at Ambient Temperature or 5°C]

Polmer Situmorang, E Triwulanningsih, T Sugiarti,
DA Kusumaningrum dan RG Sianturi

Balai Penelitian Temak
PO Box 221, Bogor 16002, Indonesia

ABSTRACT

The study was conducted in Research Institute for Animal Production (RIAP)-Ciawi. Semen was collected from 3 bulls twice a week by artificial vagina (AV), diluted in Tris buffer (control) and containing of 0.0625% formalin, reducing pH to 5.5 or their combination to temporally inhibit the motility of sperm. Diluted semen were store at ambient temperature for 0, 3 and 24 hours or at 5°C for 0, 3 and 7 days. Reactivation of motility was performed by dilution of formalin and bring the pH to 7.0. In ambient temperature, formalin and pH significantly ($p < 0.01$) inhibit the motility of sperm, but these inhibition was reversible. The percentage of motility was significantly higher ($p < 0.01$) in formalin than in pH 5.5 or control, following 24 hours of storage periode. The inhibition effect of combination between formalin and pH was non permanent. It is show that the inhibition effect of treatments was permanent for semen stored at 5°C.

Kata kunci/key words: Inseminasi buatan/artificial insemination, spermatozoa, formalin, daya hidup spermatozoa/spermatozoa viability.

PENDAHXLUAN

Teknologi inseminasi buatan (IB) telah secara luas digunakan untuk meningkatkan produksi temak khususnya ternak sapi. Teknologi ini disamping meningkatkan produksi secara kuantitas juga kualitas ternak dengan menggunakan semen pejantan yang unggul. Teknologi IB telah diperkenalkan di Indonesia sejak tahun 1970-an, akan tetapi persentase kebuntingan yang didapat khususnya pada tingkat lapangan masih sangat rendah.

Salah satu teknologi yang mendukung keberhasilan program IB adalah teknologi pengawetan semen yang memungkinkan daya hidup spermatozoa post-ejakulasi dapat diperpanjang. Secara umum IB dilakukan dengan menggunakan semen beku, akan tetapi penggunaan semen beku ini menghadapi beberapa masalah antara lain sekitar 30% spermatozoa akan mati selama pembekuan, dan spermatozoa yang bertahan hidup selama pembekuan umumnya mempunyaifertilitasyangrendah(Goldmanefa/., 1991). Hambatan lain khususnya pada tingkat pedesaan yang cukup dominan membatasi penggunaan semen beku adalah keterbatasan penyediaan nitrogen cair, container

maupun termos (Sitepu dan Dharsana, 1997; Bestari *et al*, 1998). Disamping semen beku, penggunaan semen dalam bentuk cair telah dilaporkan sejak tahun 1945-an oleh peneliti di Uni Soviet. Pengencer yang digunakan mulai dari yang sangat sederhana sampai yang kompleks mempunyai keunggulannya tersendiri. Penggunaan CUE- Tris yang mengandung 5% kuning telur telah dilaporkan oleh Davis *et al* (1963), dan Foote (1970) dan kemudian ditingkatkan oleh Shanon *et al* (1980). Keterbatasan daya hidup spermatozoa pada penyimpanan diatas suhu 5°C diduga berhubungan dengan defisit energi dan kerusakan membran akibat ketuaan ataupun reaksi peroksida dari lemak dan penambahan antioxidant dilaporkan dapat memperkecil kematian spermatozoa (Foote dan Parks, 1993). Sementara itu Triwulanningsih *et al* (2003) menyatakan bahwa penambahan antioxidant glutathion sebanyak 0,5 mM ke dalam medium pengencer semen cair yang disimpan pada suhu 5°C memberikan hasil yang terbaik dibandingkan penambahan sebesar 1,0 mM maupun 1,5 mM; dapat dikatakan bahwa penambahan 0,5 mM glutathion ke dalam pengencer semen cair dapat meningkatkan viabilitas semen cair yang disimpan pada

suhu 5°C dan mungkin dapat mencegah kerusakan spermatozoa akibat radikal bebas. Hasil yang berbeda didapat pada kondisi epididymis dimana spermatozoa ternak mamalia pada umumnya dapat bertahan hidup 2-3 minggu (Badford, 1975; Hafez and Hafez, 2000). Secara umum dianggap bahwa sperma yang disimpan pada bagian cauda epididymis adalah dalam keadaan tidak motil (Hunter, 1984; Hunter dan Wilnut, 1984) dengan tujuan menghemat energi yang nanti diperlukan selama transportasi di saluran reproduksi betina dan untuk pembuahan. Keadaan spermatozoa yang tidak motil ini telah dilaporkan pada tikus (Morton *et al*, 1978), hamster (Morton *et al*, 1978), dan sapi (Cascieri *et al*, 1976). Faktor yang dapat menghambat motilitas spermatozoa telah dilaporkan terdapat pada cairan cauda epididymis (Carr dan Acott, 1984) dan kemampuan zat penghambat ini sangat berhubungan dengan pH (Acott dan Carr 1984).

Berdasarkan fakta tersebut diatas maka pendekatan pengawetan semen untuk suhu penyimpanan diatas 5°C dengan usaha menonaktifkan metabolisme sel untuk sementara menjadi pemikiran yang perlu dipertimbangkan. Keberhasilan pengawetan semen pada suhu di atas 5°C ini sangat tergantung pada keberhasilan untuk menekan pertumbuhan mikro-organisme dan mempertahankan membranyang stabil. Beberapa zat penghambat motilitas telah dilaporkan antara lain fluoride (Tash and Mann, 1973), 2-deoxy-glucose (Mann and Lutwak-Mann, 1981), potasium cyanida atau carbonyl-cyanide-chlorophenyl hydrazone (Bretbartef *ah*, 1990). Secara umum dilaporkan bahwa tidak ada satu zat kimia tersebut diatas yang dapat memberikan hasil yang memuaskan dan keberhasilan untuk mendapatkan spermatozoa yang dapat aktif kembali sangat dipengaruhi konsentrasi dari masing masing zat yang digunakan. Penelitian yang akan dilaporkan disini adalah mempelajari pengaruh penambahan formalin sebagai penghambat motilitas spermatozoa untuk sementara pada pengencer dengan pH yang rendah.

MAIERIDANMETODE

Penelitian dilakukan di Balai Penelitian Ternak (Balimak) Ciawi, dengan menggunakan tiga (3) ekor

sapi jantan dewasa yang dikandangkan secara individu pada kandang dengan ukuran 3x3 m. Pakan hijauan berupa rumput gajah dan minuman diberikan secara *ad libitum* sedang konsentrat komersial yang dibeli dari koperasi (KPS) sebanyak 8 kg/ekor/hari, diberikan sebagai suplementasi.

Semen ditampung dengan menggunakan vagina buatan dan frekuensi penampungan adalah 2 kali seminggu. Secepatnya setelah penampungan, semen dibawa ke laboratorium dan waktu antara penampungan sampai pengenceran tidak lebih dari 15 menit. Pengencer yang digunakan adalah pengencer Tris-citrat yang mengandung 5 % v/v kuning telur (KT).

Secepatnya setelah evaluasi, pengenceran pertama dilakukan pada suhu 35°C dengan pengencer bagian A (mengandung glycerol 2,4% v/v dengan empat perlakuan yaitu (1) kontrol, (2) penghambatan motilitas dengan menurunkan pH sampai 5,5 dengan menambahkan asam sitrat sedemikian rupa hingga pH yang diharapkan tercapai tanpa memperhatikan volume penambahan, (3) penambahan formalin 0,0625% dan (4) kombinasi antara pH 5,5 dan formalin 0,0625%. Derajat pengenceran dilakukan untuk mendapatkan total konsentrasi sperma yang hidup 100 juta per ml. Setelah pengenceran pertama sampel dibagi dua yaitu sebahagian untuk penyimpanan pada suhu ruangan (18-25°C) dan sebahagian lagi untuk penyimpanan pada suhu 5°C. Pengenceran kedua dilakukan dengan menggunakan pengencer bagian B (mengandung glycerol 5,6 % v/v) yang jugaterdiri dari masing-masing 4 perlakuan dengan jumlah volume yang sama dengan pengencer bagian A sehingga konsentrasi spermatozoa akhir menjadi 50 juta per ml dan glycerol 4% v/v. Untuk penyimpanan pada suhu 5°C, penurunan temperatur dilakukan secara perlahan-lahan dengan menggunakan mesin pendingin dengan kecepatan penurunan suhu 0,5°C/menit. Pengencer bagian B dari masing-masing perlakuan yang diuji ditambahkan dalam 3 kali penambahan dengan volume yang sama yaitu setelah temperatur mencapai 15; 10 dan 5°C.

Pengaktifan kembali

Pengaktifan kembali motilitas dilakukan dengan cara mengencerkan formalin dan menaikkan

pH melalui penambahan pengencer Tris-citrat kontrol (tidak mengandung formalin dengan pH 7,0). Untuk menaikkan pH, pengencer tris sitrat control ditambahkan sedemikian rupa tanpa memperhatikan volume sampai pH menjadi 7 dan pencucian/sentrifugasi. Pengenceran formalin dilakukan dengan menambahkan Tris sitrat control dengan derajat pengenceran 6 kali sehingga konsentrasi formalin menjadi kurang dari 0,001%.

Waktu evaluasi

Daya hidup spermatozoa ditentukan dengan mengevaluasi persentase sperma motil (%M), sperma yang hidup (%H) dan sperma dengan tudung akrosom utuh (%TAU). Mikroskop cahaya dengan pembesaran 400X digunakan untuk evaluasi %M, sedang untuk evaluasi %H dilakukan dengan pembesaran 1000X menggunakan pewarnaan eosin negrosin. Evaluasi %TAU dilakukan menggunakan mikroskop fase kontras dengan pembesaran 1000X. Evaluasi dilakukan setelah 0, 3 dan 24 jam untuk semen yang disimpan pada suhu ruangan dan 0, 3 dan 7 hari penyimpanan pada suhu 5°C. Evaluasi 0 jam dilakukan beberapa saat setelah tercapai suhu 5°C sebelum sample dipindahkan ke dalam lemari pendingin untuk suhu penyimpanan 5°C. Rancangan penelitian adalah rancangan acak lengkap dan seluruh data yang diperoleh dianalisa secara statistik mengikuti metode Stell and Torrie (1991).

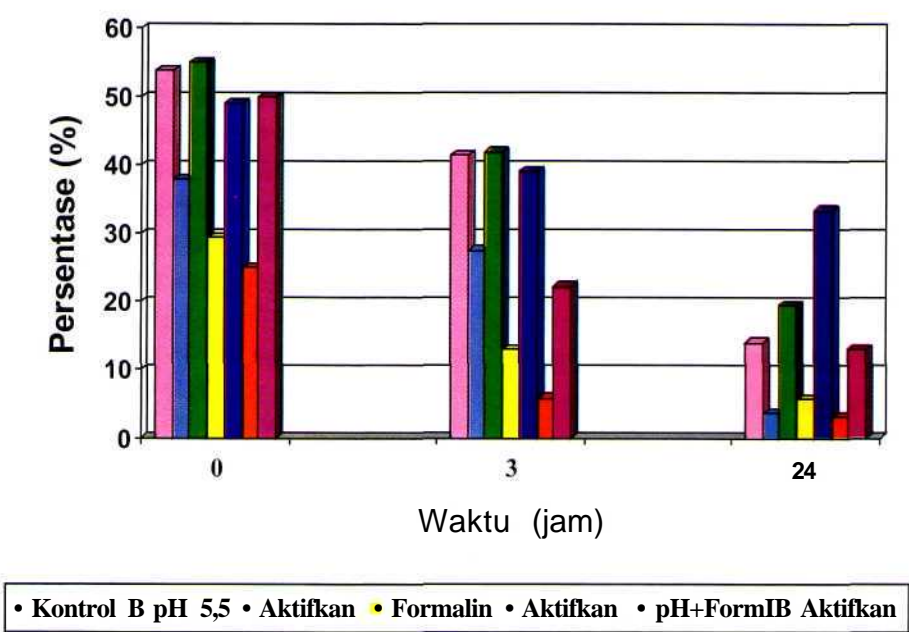
HASIL

Dari total 32 ejakulat yang diamati didapat hasil bahwa penambahan formalin sebanyak 0,0625% maupun penurunan pH ke 5,5 sangat nyata dapat menghambat ($P < 0,01$) motilitas dari spermatozoa yang disimpan pada suhu ruangan maupun 5°C (Gambar 1). Rataan %M setelah penyimpanan selama 0, 3 dan 24 jam pada suhu ruangan untuk perlakuan pH dan penambahan formalin, lebih rendah ($P < 0,01$) yaitu 38,0; 27,5; 3,6% dan 29,5; 12,9; 5,7% dibanding kontrol yaitu 53,8; 41,5 dan 14,0%. Akan tetapi penghambatan motilitas ini terbukti hanya bersifat sementara karena setelah pengaktifkan kembali dengan jalan pengenceran didapat %M yang meningkat sangat nyata ($P < 0,01$) menjadi 55,0; 41,9; 19,4% dan 49,0; 39,1; 33,4% berturut turut untuk perlakuan pH dan formalin periode

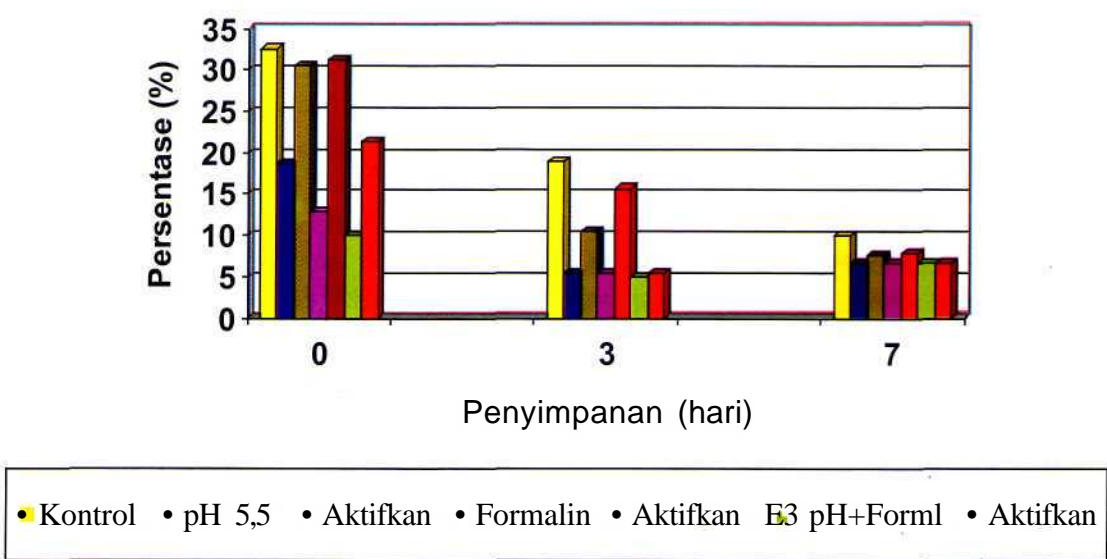
penyimpanan 0,3 dan 24 jam. Persentase motil setelah diaktifkan kembali, tidak berbeda nyata antara perlakuan pH, formalin dan kontrol selama penyimpanan 0 dan 3 jam pada suhu ruangan. Hasil yang berbeda didapat setelah penyimpanan selama 24 jam, dimana persentase motil setelah diaktifkan kembali, nyata lebih tinggi ($P < 0,01$) pada perlakuan formalin (33,4%) dibanding kontrol (14,0%). Ada kecenderungan persentase motil pada perlakuan pH (19,4%) lebih tinggi dibanding kontrol akan tetapi perbedaan ini tidak nyata secara statistik ($P > 0,05$).

Pada semen yang disimpan pada suhu 5°C (*Chilled semen*), pengaruh perlakuan pH dan formalin masih efektif menghambat motilitas spermatozoa untuk sementara selama penyimpanan sampai 3 hari, akan tetapi pada penyimpanan yang lebih lama (7 hari), pengaruh tersebut tidak efektif. Rataan %M setelah diaktifkan kembali pada perlakuan pH dan formalin tidak berbeda ($P < 0,05$) dibanding kontrol pada penyimpanan 0 hari. Penyimpanan yang lebih lama yaitu 3 dan 7 hari, menunjukkan %M yang nyata lebih rendah ($P < 0,05$) pada perlakuan pH dan formalin dibanding kontrol (Gambar 2). Kombinasi penambahan formalin dan penurunan pH lebih efektif menghambat motilitas spermatozoa baik yang disimpan pada suhu ruangan maupun setelah didinginkan ke 5°C. Akan tetapi usaha penghambatan motilitas untuk sementara ini hanya efektif pada penyimpanan selama 0 dan 3 jam untuk semen yang disimpan pada suhu ruangan dan 0 jam pada semen dingin. Penyimpanan yang lebih lama menunjukkan bahwa penghambatan motilitas sudah menjadi bersifat permanen, dimana tidak didapat perbedaan yang nyata pada %M antara sebelum maupun sesudah pengaktifan kembali (Tabel 1).

Pengaruh perlakuan terhadap %H dan %TAU terlihat pada Tabel 1 dan 2. Pada kondisi suhu ruangan pemberian masing masing formalin dan pH secara terpisah, tidak nyata mempengaruhi %H. Didapat kecenderungan %H lebih rendah pada perlakuan pH setelah penyimpanan selama 3 dan 24 jam akan tetapi perbedaan ini tidak nyata secara statistik. Kombinasi penambahan formalin dan penurunan pH nyata secara statistik ($P < 0,05$) menurunkan %H setelah penyimpanan selama 3 dan 24 jam. Hal yang sama didapat pada %TAU dimana hasil yang cenderung



Gambar 1. Pengaruh pH dan formalin trhadap persen motil sperma setelah disimpan pada suhu ruang.



Gambar 2. Pengaruh formalin terhadap persen motil sperma setelah penyimpanan pada suhu 5° C

Tabel 1. Persentase sperma motil (%H) setelah penyimpanan pada suhu ruangan maupun 5°C

Perlakuan	Waktu penyimpanan					
	Suhu Ruangan (Jam)			5°C (Hari)		
	0	3	24	0	3	7
Kontrol	63,8'	56,1'	48,2'	43,9'	23,8'	16,8'
pH5,5	67,6'	53,9'	41,3'	36,4 ^b	14,7 ^b	8,2 ^b
Formalin	67,1'	54,5'	50,8'	41,9'	21,0'	12,3'
PH+ For.	66,7'	44,4 ^b	32,2 ^b	30,1"	16,8 ^b	9,1 ^b

Keterangan: Angka pada kolom yang sama dengan huruf yang sama dibelakangnya menunjukkan nilai yang tidak berbedanyata (P<0,05)

Tabel 2. Persentase sperma motil (%TAU) setelah penyimpanan pada suhu ruangan maupun 5°C

Perlakuan	Waktu penyimpanan					
	Suhu Ruangan (Jam)			5°C (Hari)		
	0	3	24	0	3	7
Kontrol	43,9'	36,5'	32,1'	23,8'	18,5'	15,5'
pH5,5	44,2'	33,1'	30,7'	16,6 ^b	10,4 ^b	4,9 ^b
Formalin	42,2'	39,5'	28,1"	21,6'	16,4'	12,5'
PH+ For.	42,3'	31,6'	22,6"	14,6 ^b	10,8 ^b	4,5"

Keterangan: Angka pada kolom yang sama dengan huruf yang sama dibelakangnya menunjukkan nilai yang tidak berbedanyata (P<0,05)

lebih rendah didapat pada perlakuan formalin maupun pH akan tetapi perbedaan ini tidak nyata secara statistik. Pengaruh penurunan pH secara tersendiri maupun dikombinasikan dengan penambahan formalin, nyata secara statistik mempengaruhi daya hidup spermatozoa yang disimpan pada suhu 5°C dimana rata-rata %M dan %TAU nyata lebih rendah (P<0,05) dibanding kontrol.

PEMBAHASAN

Kemampuan baik formalin maupun penurunan pH untuk tujuan menghambat motilitas spermatozoa untuk sementara yang didapat pada penelitian ini

selaras dengan hasil yang dilaporkan oleh peneliti terdahulu (Dott dan Foster, 1975). Carr and Acott (1984) melaporkan bahwa larutan epididymis mempunyai kemampuan untuk menonaktifkan *cauda sperm* untuk sementara dalam kondisi pH yang rendah.

Walaupun pH yang rendah dapat menghambat motilitas spermatozoa, akan tetapi didapat kenyataan bahwa sebagian besar spermatozoa menjadi tidak motil secara permanen. Hal ini ditunjukkan dari daya hidup spermatozoa setelah diaktifkan kembali yang lebih rendah dibanding kontrol. Perbedaan yang didapat pada penelitian ini dibanding penelitian

terdahulu(CarrandAcott, 1984;AcottandCarr, 1984) sebagai akibat dari perbedaan sperma yang digunakan, dimana pada penelitian ini menggunakan ejakulat semen sedang peneliti terdahulu menggunakan semea berasal dari cauda epididymis.

Didapat bukti bahwa didalam perjalanan spermatozoa mulai dari testes sampai ejakulat mengalami berbagai perubahan fisiologis sehingga kondisi membran dan motilitas spermatozoa berbeda pada setiap segment bahkan dalam satu ejakulatpun didapat variasi kualitas spermatozoa yang sangat besar sehingga respon masing-masing terhadap penurunan pH bervariasi. Hal ini selaras dengan hasil penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa usaha untuk menghambat motilitas spermatozoa untuk sementara dari ejakulat semen jauh lebih sulit daripada spermatozoa epididymis sebagai konsekuensi keragaman kualitas spermatozoa per ejakulat (Watson,1993). Kemungkinan lain dari rendahnya daya hidup spermatozoa setelah pengaktifan kembali disebabkan menurunnya pH selama penyimpanan sebagai konsekuensi meningkatnya asam laktat dari hasil metabolisme sel. Norman *et al* (1958) yang dikutip oleh Vishwanatth and Shanon (2000) menyimpulkan bahwa penurunan pH ke 5,5 masih bisa ditolerir oleh spermatozoa akan tetapi dibawah 5,5 menjadi berbahaya pada kehidupan spermatozoa akibat denaturasi enzim yang permanen.

Keasaman akan mempengaruhi struktur kimia kuning telur dan kemungkinan besar protein maupun lipid protein akan terdenaturasi sehingga tidak efektif lagi sebagai bahan yang dapat melindungi spermatozoa dari lingkungan yang tidak baik khususnya pendinginan. Hasil yang sama didapat pada penelitian terdahulu bahwa didapat interaksi yang nyata antara pH dan kuning telur dimana pH yang rendah lebih baik mempertahankan daya hidup spermatozoa pada pengencer tanpa kuning telur dibanding pengencer dengan kuning telur (Situmorang *et al*, 2001). Kerusakan kuning telur sebagai konsekuensi penurunan pH terlihat dengan % H dan %TAU yang nyata lebih rendah pada perlakuan pH baik tersendiri maupun kombinasi dengan formalin dibanding kontrol baik pada penyimpanan suhu ruangan selama 24 jam.

Kerusakan kuning telur ini menjadi lebih jelas pada kondisi 5°C dimana % H dan % TAU sudah nyata lebih rendah pada saat temperatur diturunkan ke 5°C dan berlanjut setelah penyimpanan selama 3 dan 7 hari. Perlindungan kuning telur telah dilaporkan melalui kemampuan melindungi membran selama pendinginan. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan peneliti terdahulu yang menunjukkan kuning telur maupun susu dapat melindungi membran dari pengaruh buruk pengenceran, pendinginan maupun pembekuan (Watson, 1993; Maxwell and Salamon, 1993). Kerusakan membran akrosom yang ditandai dengan menurunnya % TAU mengakibatkan ketidak mampuan spermatozoa membuahi sel telur pada proses fertilisasi.

Walaupun formalin efektif menghambat motilitas sperma untuk sementara akan tetapi efektifitasnya tidak terlihat apabila dikombinasikan dengan pH yang rendah baik pada kondisi suhu ruangan maupun 5°C. Penjelasan yang dapat diberikan adalah didapat sinergi kedua bahan tersebut untuk mempengaruhi daya hidup spermatozoa disamping kerusakan kuning telur pada kondisi 5°C. Kemampuan suatu bahan untuk menghambat motilitas spermatozoa sangat tergantung dari konsentrasi dari bahan penghambat.

Daya hidup yang masih tetap terbatas dalam kondisi metabolisme yang dihambat (penghematan energi) menunjukkan bahwa daya hidup tidak hanya ditentukan oleh keterbatasan energi saja. Davis *et al* (1963) menunjukkan bahwa penambahan fruktosa maupun glukosa tidak dapat memperpanjang daya hidup spermatozoa yang disimpan pada suhu ruangan maupun 5°C. Hal ini berarti selain energi, kerusakan dan perubahan membran selama penyimpanan merupakan faktor lain untuk menentukan keberhasilan penyimpanan spermatozoa dalam suhu ruangan maupun 5°C.

Perubahan yang terjadi selama penyimpanan meliputi penurunan motilitas, morfologi dan fertilitas spermatozoa. Perubahan membran bisa terjadi sebagai konsekuensi penuaan, reaksi akrosom yang terjadi secara alami setelah ejakulasi maupun disebabkan kerusakan akibat reaksi peroksida lemak (Hammerstedt, 1993).

KESIMPULAN

Penambahan 0,0625% formalin dan pH 5,5 yang diberikan secara masing-masing ataupun bersama-sama dapat secara nyata menghambat motilitas spermatozoa sapi untuk sementara waktu pada penyimpanan suhu ruangan sampai 24 jam (18-25°C). Tidak didapat perbedaan yang nyata pada % H maupun % TAU. Persentase motil setelah pengaktifan kembali didapat tertinggi pada perlakuan formalin selama 24 jam penyimpanan. Untuk penyimpanan pada suhu 5°C, penambahan formalin tidak efektif untuk menghambat motilitas spermatozoa untuk sementara waktu dimana daya hidup spermatozoa setelah pengaktifan kembali tidak berbeda dengan control. Penurunan pH ke 5,5 nyata menurunkan daya hidup spermatozoa.

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi formalin, pH yang optimal, interaksi antara kuning telur dan pH untuk penyimpanan yang lebih lama. Data keberhasilan inseminasi buatan (IB) di lapangan dengan menggunakan spermatozoa pasca penyimpanan khususnya untuk penyimpanan pada suhu ruangan perlu diketahui untuk aplikasi yang lebih luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Acott ST and DW Carr. 1984.** Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biology Reprod.* 30, 926-935.
- Bedford JM. 1975.** Maturation, transport and fate of spermatozoa in epidymis. In: *Hand book of Physiology*. Section 7: *Endocrinology* 5: Male reproduction system, 303-317.
- Bestari J, AR Siregar, Y Sani dan P Situmorang. 1998.** Produktivitas empat bangsa pedet sapi potong hasil IB di Kabupaten Agam Propinsi Sumatera Barat: I. Perubahan bobot badan sampai 120 hari. *Prosiding Seminar Nasional Peternakan Dan Veteriner I*, 181-190.
- Brethart H. R Wehbie and HA Lardy. 1990.** Calcium transport in bovine sperm mitochondria: Effects of substrates and phosphate. *Biochem. Biophys. Ada* 1026, 57-63.
- Carr DW and ST Acott. 1984.** Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid. I. Studies of a sperm motility quiescence factor. *Biol. Reprod* 30, 913-925.
- Cascieri M, RP Amann and RH Hammerstedt. 1976.** Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm motility. *J. Biol. Chem.* 251, 787-793.
- Davis IS, RW Bratton and RH Foote. 1963.** Livability of bovine spermatozoa at 5 Oc in tris-buffered and citrate-buffered egg yolk-glycerol extender. *J. Dairy Sci.* 46, 333-336.
- Dott HM and GC Foster. 1975.** Preservation of differential staining of spermatozoa by formolcitrate. *J. Reprod. Fert.* 45, 57-60.
- Foote RH. 1970.** Fertility of bull semen at high extension rate in tris-buffered extender. *J. Dairy Sci.* 53, 1478-1482.
- Foote RH and EJ Parks. 1993.** Factors affecting preservation and fertility of bull sperm: a brief review. *Reprod. Fert. Dev.* 5, 665-773.
- Goldman EE, JE Ellington, FB Farrel and RH Foote. 1991.** Use of fresh and frozen thawed bull sperm invitro. *Theriogenology.* 35, 204.
- Hafez ESE and Hafez B. 2000.** *Reproduction in Farm Animals*. Seventh Edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hammerstedt RH. 1993.** Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effects on design and storage preservation system. *Reprod. Fert. Div.* 5, 675-690.
- Hunter RHF. 1984.** Preovulatory arrest and preovulatory redistribution of component spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J.Reprod. Fert.* 72, 203-211.
- Hunter RHF and I Wilmut. 1984.** Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.* 24, 597-608.
- Maxwell VMC and S Salamon. 1993.** Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod.Fert. Dev.* 5, 613-618.
- Morton B and TSK Chang. 1973.** The Effect of fluid from cauda epidymis serum components and caffeine upon the survival of diluted epididymal hamster spermatozoa. *J Reprod. Fert.* 35,255-263.
- Morton B, R Sagredraca and C Fraser. 1978.** Sperm motility within mamalian epididymis: species variation and corelation with free calcium levels in epididymal plasma. *Fert. Steril.* 29, 695-698.
- Sitepu P dan R Dharsana. 1997.** Aplikasi inseminasi buatan (IB) di Propinsi Lampung: penanganan dan penyimpanan frozen semen. *Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner JiIdII*,317-328.
- Situmorang P, E Triwulaningsih, A Lubis, T Sugiarti dan C Wiwie. 2001.** Optimalisasi penggunaan penghambat aktifitas spermatozoa untuk sementara terhadap daya hidup spermatozoa yang disimpan pada suhu ruangan maupun

5°C. *Laporan Akhir Penelitian Tahun Anggaran 2000 di Balai Penelitian Ternak, Ciawi.*

Stell RGD and JH Torrie 1991. *Prinsip Dan Prosedur Statistika.* Gramedia Utama, Jakarta.

Tash JS and T Mann. 1973. Adenosin 3,5 cyclic monophosphate in relation to motility and senescence of spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.* **184**, 109-114

Triwulanningsih E, P Situmorang, T Sugiarti, RG Sianturi dan DA Kusumaningrum. 2003.

Pengaruh penambahan glutathione pada medium pengencer sperma terhadap kualitas semen cair (*chilled semen*) *JITVS* (2), 91-97.

Vishwanath R and P Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* **62**, 23-53.

Watson PF. 1993. The potential impact of sperm encapsulation technology on the importance of timing artificial insemination : a perspective in the light of published work. *Reprod. Fert. Dev.* **3**, 691-699.